

Genetisk isolasjon mellom fjordbassenger hos benthiske evertebrater

Fagrapport



Hovedkontor

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00
Internett: www.niva.no

NIVA Region Sør

Jon Lilletuns vei 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 37 04 45 13

NIVA Region Innlandet

Sandvikaveien 59
2312 Ottestad
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 62 57 66 53

NIVA Region Vest

Thormøhlensgate 53 D
5006 Bergen
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 55 31 22 14

Tittel Genetisk isolasjon mellom fjordbassenger hos benthiske evertebrater	Løpenummer 7129-2017	Dato 10. mars 2017
Forfatter(e) Hobæk, Anders Birkeland, Ina Haug, Lisa Maria Hagalid Glennér, Henrik	Fagområde Marin biologi	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Vestlandet	Utgitt av NIVA

Oppdragsgiver(e) Norges Forskningsråd Syd-Varanger Gruve AS, Rana Gruber AS, Titania AS, Nordic Mining ASA	Oppdragsreferanse 204033
Oppdragsgivers utgivelse:	Heftenr.:

Sammendrag

Rapporten redegjør for resultater fra arbeidspakke 4 i prosjektet «Improved submarine tailing placements (STPs) in Norwegian fjords», med fokus på genetisk differensiering mellom populasjoner av bunnlevende evertebrater i norske fjorder. Genetisk variasjon hos tre arter ble estimert ved å analysere mikrosatellitter hos tre arter: *Munida sarsi* (en trollhummer), *Astarte sulcata* (en musling) og *Diastylodes serratus* (en halekreps). I den første av disse fant vi igjen genetisk differensiering innen eller mellom fjorder, noe som var forventet ut fra artens svært gode spredningsevne i larvestadiet. De to andre artene mangler frittlevende larvestadier og antas derfor å ha begrenset spredningsevne. Hos disse artene kunne vi påvise statistisk signifikant differensiering mellom fjordbassenger og mellom fjorder.

Resultatene indikerer at deponering av avgangsmasser i en del av en fjord kan ha konsekvenser for bunnlevende organismer også i andre deler av fjorden, dersom deponeringsområdet fungerer som en kildepopulasjon for tilgrensende områder.

Fire emneord	Four keywords
1. Biologisk mangfold	1. Biodiversity
2. Marine evertebrater	2. Marine macroinvertebrates
3. Populasjonsgenetikk	3. Population genetics
4. Fjorddeponering	4. Submarine mine tailings



Prosjektleder



Forskningsleder

**Genetisk isolasjon mellom fjordbassenger
hos benthiske evertebrater**

Arbeidspakke 4 i ImpTail-prosjektet

Forord

Rapporten redegjør for resultater fra arbeidspakke 4 i ImpTail-prosjektet. Arbeidet er gjennomført som et samarbeid mellom NIVA og Institutt for biologi, Universitetet i Bergen (BIO, UiB). Materiale til prosjektet er sikret under tokt med forskningsfartøyet Hans Brattstrøm i regi av UiB, og dessuten supplert med materiale samlet ved andre tidligere UiB-tokt. Bernt Rydland Olsen stilte materiale fra en tidligere undersøkelse av *Astarte* til rådighet. Arbeidet med molekylære markører er utført ved DNA-laboratoriet til BIO, med assistanse fra Louise Lindblom, David Rees, Kenneth Meland, Roman Machado Tamayo og Solveig Thorkildsen. Geir Dahle ved Havforskningsinstituttet har bistått ved å ta ansvar for fragmentanalyser av genetiske markører. Markus Lindholm har kvalitetssikret rapporten. Takk til alle for verdifull hjelp.

Bergen, 10. mars 2017

Anders Hobæk

Innholdsfortegnelse

1 Innledning	7
2 Materiale og metoder	9
2.1 Studie organismer.....	9
2.1.1 Munida sarsi	9
2.1.2 Diastylodes serratus	10
2.1.3 Astarte sulcata.....	10
2.2 Utvikling av genetiske markører	11
2.3 Innsamling av materiale	11
2.4 Laboratoriearbeid.....	11
2.5 Databearbeidelse	12
3 Resultater	13
3.1 Munida sarsi	13
3.2 Astarte sulcata.....	16
3.3 Diastylodes serratus	19
4 Diskusjon	21
5 Konklusjon	23
6 Litteratur	24

Sammendrag

Rapporten redegjør for arbeid utført innen arbeidspakke 4 av ImpTail-prosjektet (Improved submarine tailing placements in Norwegian fjords). Målsettingen var å teste om bunnlevende dyr med lav mobilitet kan være genetisk differensiert mellom fjorder og mellom ulike bassenger innen fjorder. Dette vil kunne ha betydning både for rekolonisering av fjordbasseng etter deponering avgangsmasser fra gruvedrift, og for små og isolerte populasjoner som er avhengige av noe immigrasjon for å opprettholde bestanden over lengre tidsrom.

Arbeidet fokuserte på tre bunnlevende evertebrater med ulike forutsetninger for passiv spredning. Alle lever på dypt vann i fjordene våre. Trollhummeren *Munida sarsi* er bunnlevende som voksen, men produserer mange larver som lever fritt (pelagisk) opptil flere måneder, og antas derfor å ha svært god spredningsevne. Muslingen *Astarte sulcata* har svært begrenset mobilitet, da eggene befruktes og utvikles i mordyret og slippes fri som små muslinger uten svømmeevne. Krepsdyret *Diastylodes serratus* har også yngelpleie og mangler frittlevende larvestadium, men har likevel en begrenset evne til å svømme. For begge de sistnevnte arter forventet vi dårlig spredningsevne.

Genetisk differensiering mellom populasjoner ble estimert ved å analysere variasjon i mikrosatellitter, en type genetiske markører som ofte omtales som hypervariable fordi de muterer lett. 10 slike markører ble utviklet for hver av artene i dette prosjektet. Materiale for alle tre arter ble samlet i Førdefjordens indre, midtre og ytre del, og supplert med materiale samlet inn en rekke andre steder langs kysten for å øke geografisk dekning.

For *Munida sarsi* ble det ikke påvist noen geografisk struktur i genetisk variasjon som var statistisk signifikant forskjellig fra null. Dette bekrefter forventningen om svært god spredningsevne. De to andre artene viste derimot signifikante forskjeller mellom fjorder og mellom bassenger i Førdefjorden. For *Astarte* fant vi også markant forskjell mellom to stasjoner bare 250 m fra hverandre i et annet område.

Resultatene indikerer at bentiske arter uten pelagiske larvestadier kan være genetisk differensiert mellom ulike bassenger i en fjord, og at spredning mellom bassengene kan være begrenset. Marginale populasjoner i delvis isolerte deler av et fjordsystem kan være avhengig av immigrasjon for å bestå over lengre tid, som del av en større meta-populasjon. Deponering av avgangsmasser i et fjordbasseng som fungerer som kildepopulasjon (‘source population’) for andre bassenger vil derfor kunne ha effekter utover selve deponiområdet. Dette vil avhenge av habitatkvalitet, populasjonsstørrelse og reproduksjonsrate hos de ulike arter, og det vil være hensiktsmessig å utrede om aktuelle deponiområder kan ha slik betydning for tilgrensende deler av fjordsystemet.

Summary

Title: Genetic connectivity among fjord basins in benthic invertebrates

Year: 2017

Author: Hobæk, A., Birkeland, I.B., Haug, L.M.H, Glenner, H.

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN 978-82-577-6864-5

We report on results from Work Package 4 of the ImpTail project (Improved submarine tailing placements in Norwegian fjords). The aim of this work was to test whether benthic animals with poor dispersal ability can be genetically differentiated among fjords and among deep basins within fjords. Such differentiation could impact on recolonization of fjord basins after tailing deposition terminates, and also on small isolated populations that depend on immigration to sustain their stocks in a longer term.

We focused on three deep-water benthic invertebrates, which were expected to differ markedly in dispersal abilities. The squat lobster *Munida sarsi* remains benthic in the adult stage, releasing large numbers of free-swimming larvae, which live as zooplankton for several months. Thus, this species was expected to have very good dispersal capability. In contrast, the mussel *Astarte sulcata* has very limited mobility. Their eggs are brooded within the mother's shell, and are released as small but fully developed mussels without any swimming ability. The third species, another crustacean *Diastylodes serratus* is also a brooder lacking a free-living larval stage, and is only capable of a little swimming. Our expectation was that the two latter species had poor dispersal abilities.

Genetic differentiation between populations was estimated by analyzing allelic variation in microsatellites, which is a type of genetic marker known as hypervariable due to high mutation rates. 10 such markers were developed for each species within the project. We collected animals from three basins in the Førdofjord (inner, middle and outer basins), and supplementary material from several other stations along the coast was also analyzed to extend the geographic coverage.

In *Munida sarsi*, differentiation was very low, and not statistically different from zero, thus confirming our expectation of very good dispersal ability in this species. By contrast, we found low, but statistically significant genetic differentiation among fjords and fjord basins in the other two species. In the case of *Astarte sulcata*, we detected a marked differentiation between two stations separated by only 250 m.

The results indicate that species with limited dispersal capabilities can be genetically differentiated among fjord basins, and dispersal between basins can thus be limited. Marginal populations in partly isolated basins can be dependent on immigration to remain viable in the long term. Deposition of mine tailings in a basin which functions as a source population for other basins could thus potentially affect regions beyond the deposition area itself. Such an effect is likely to depend on factors like habitat quality, population size and reproductive rates of different species. We suggest that it may be desirable to investigate whether fjord basins selected for tailing deposition may have such importance for adjacent fjord basins.

1 Innledning

Prosjektet «Improved submarine tailing placements (STPs) in Norwegian fjords» er et KMB-prosjekt under forskningsprogrammet Hav og Kyst, finansiert av Norges Forskningsråd og fire gruveselskaper: Syd-Varanger Gruve AS, Rana Gruber AS, Titania AS og Nordic Mining ASA. Målsettingen med prosjektet var å bidra til et kunnskapsgrunnlag for å forbedre metoder benyttet ved undersjøisk deponering av gruveavgang. Dette omfattet fire arbeidspakker med følgende tema:

1. Hva skjer med avgangsmasser etter deponering, og hvor toksiske er de?
2. Kan anrikning med organisk materiale bidra til raskere etablering av biologiske samfunn når deponeringen er ferdigstilt?
3. Kan undersjøiske rev bidra til å begrense eller styre spredning av finpartikulært materiale, og bidra til raskere akkumulasjon av organisk materiale?
4. Små populasjoner av bunnlevende organismer kan være avhengige av immigrasjon fra større populasjoner. Utgjør fjordterskler og avstand mellom fjorder viktige spredningsbarrierer for bunnlevende dyr?

Universitetet i Bergen har vært samarbeidspartner i arbeidspakkene 1, 2 og 4, og dette har delvis vært organisert som masteroppgaver. I alt fire masteroppgaver er levert fra prosjektet:

Arbeidspakke 1:

Gravdal, Julianne Konowsen Skadberg. 2013. Stability of heavy metals in submarine mine tailings: A geochemical study. Master thesis in Earth Science, University of Bergen. 77 pp.

Arbeidspakke 2:

Haugland, Barbro Taraldset. 2014. Faunal colonization of submarine mine tailings: An intertidal experiment to investigate the influence of sediment organic carbon content. Master thesis in Marine Biology, University of Bergen. 107 pp.

Arbeidspakke 4:

Birkeland, Ina Bakke. 2013. Population genetic studies of *Munida sarsi* Huus, 1935 in Norwegian fjord systems. Master thesis in Marine Biology, University of Bergen. 134 pp.

Haug, Lisa Maria Hagalid. 2015. Population genetic studies of *Astarte sulcata* (da Costa, 1778) along the coast of Western Norway. Master thesis in Marine Biology, University of Bergen. 129 pp.

Denne rapporten omhandler resultater fra Arbeidspakke 4, som fokuserte på genetisk differensiering mellom fjordbasseng og mellom fjorder hos tre bunnlevende evertebrater. Med tre ganske ulike arter har dette vært tre delvis uavhengige studier, men alle tre har Førdefjorden (ytre, midtre og indre bassenger) som et felles studieområde. Dette gjør det mulig å sammenligne resultater for de tre artene, som var forventet å utvise ulik grad av genetisk differensiering. Materiale fra Førdefjorden ble supplert med materiale fra andre områder langs kysten, for å øke geografisk avstand mellom populasjoner.

De fleste arter kan bare leve under et begrenset sett av fysiske, kjemiske og biologiske miljøforhold. For arter som lever på sjøbunnen vil f. eks. strømforhold og substrat (hard eller bløt bunn, fordeling av partikkelstørrelser som sand, silt og leire) ha stor betydning. Siden forholdene kan variere betydelig selv i tilsynelatende homogene bunnområder vil de fleste arter finne egnede habitater som større eller mindre flekker i det undersjøiske landskapet, på samme måte som på land med vekslende typer skog, myr etc. Noen flekker vil være optimale, mens andre vil være suboptimale eller marginale, og tettheten av en art vil gjerne variere med det lokale habitatets størrelse og kvalitet. Mellom flekkene kan det være større eller mindre arealer som er uegnet for arten, som derfor ikke lever her. En *metapopulasjon* består av flere slike

mindre populasjoner som lever i adskilte habitater. Små habitatflekker av dårlig kvalitet vil ha små populasjoner som ikke klarer å opprettholde bestanden ved egen rekruttering over lengre tid, siden små populasjoner er langt mer utsatt for tilfeldige svingninger og lett kan dø ut lokalt. Større habitatflekker av god kvalitet vil derimot produsere et overskudd av rekruttering, som kan (re)kolonisere andre habitatflekker dersom de kan spre seg til dem. Små og 'dårlige' habitater kan altså være avhengige av immigrasjon for å kunne bestå over lengre tid. Vi kaller større lokale populasjoner med overskudd av rekruttering '*source populations*', mens marginale populasjoner som avhenger av immigrasjon '*sink populations*'. Selv om lokale populasjoner kan svinge sterkt i tetthet og være utdødd i perioder vil metapopulasjonen kunne bestå gjennom denne dynamikken.

Metapopulasjoner er godt dokumentert blant en rekke dyr og planter på land, men er lite studert i marint miljø. I vår tilnærming har vi tenkt på dypområdet i et fjordbasseng som en lokal populasjon. Arter som lever i dypet og som er lite mobile kan ha problemer med å spre seg over grunnere terskler, som ofte deler fjorder i ulike bassenger. Dette avhenger åpenbart av artenes reproduksjonsstrategi, og spesielt om de har en pelagisk (frittssvevende eller frittssvømmende) fase i sin larveutvikling. Mange arter produserer mange egg og larver, som ved å leve en periode pelagisk kan spres passivt med strømmene over store avstander. Dette gjelder f. eks. mange krepsdyr, pigghuder og muslinger. Andre arter produserer få avkom og har yngelpleie uten noe frittssvømmende stadium. Yngel av slike arter er gjerne langt utviklet før mordyret slipper dem ut, og ligner små utgaver av de voksne. Disse artene har ikke samme mulighet for passiv spredning med strømmene, og spredningsevnen vil avhenge av dyrenes evne til å svømme aktivt eller forflytte seg langs bunnen.

Isolerte populasjoner vil over tid differensiere genetisk fra hverandre. Dette skyldes tilfeldige prosesser som mutasjon og genetisk drift. Det kan også henge sammen med en 'founder' effekt, ved at et fåtall dyr som først etablerer seg i et område vil dominere genetisk sammensetning i populasjonen i lang tid og gjennom mange generasjoner. Disse prosessene motvirkes av utveksling mellom populasjoner. Ulikt miljø kan bety ulikt seleksjonspress, som kan fremskynde genetisk endring gjennom naturlig seleksjon. Det finnes mange eksempler på slik variasjon innen arter. Tilsvarende har vi også eksempler på at fornyet kontakt mellom differensierte populasjoner kan føre til homogenisering av genetisk diversitet mellom populasjoner, som altså blir mer like hverandre. Grad av differensiering vi kan måle blir dermed et resultat av en balanse mellom prosesser som genererer forskjeller under isolasjon, og utvisking av forskjeller ved utveksling mellom populasjonene.

Deponering av avgangsmasser på fjordbunnen vil ødelegge habitatet for bunnlevende arter fullstendig i deponeringsperioden og være ubeboelig gjennom en periode etter avslutning av deponering. Dersom deponeringsområdet ødelegger viktige '*source populations*' kan også andre deler av en metapopulasjon dø ut som følge av manglende immigrasjon. Dette kan f. eks. tenkes å være mindre populasjoner i sidefjorder eller innerst i fjordene, dersom spredning mellom disse er begrenset. For å kunne forstå mer av slike mulige effekter trenger vi å kjenne grad av differensiering, og dermed effektiv spredning, mellom lokale populasjoner. Det er dette problemkomplekset vi har ønsket å belyse i denne delen av prosjektet. Betydningen av spredning gjelder også i forhold til mange andre former for inngrep som kan tenkes å ødelegge eller redusere viktige deler av en metapopulasjon, og dermed få mer vidtrekkende effekter enn forventet.

Ut fra problemstillingene beskrevet over startet arbeidspakke 4 med to hypoteser. Sitert fra prosjektsøknaden så null-versjonene av hypotesene slik ut:

H1₀ *Brooding species are not genetically distinct in different basins of a fjord*

H2₀ *Larval-dispersing species with a pelagic larval stage are not genetically distinct in different basins of a fjord*

For å teste hypotesene har vi fokusert på tre arter med antatt svært ulik spredningsevne. To av disse har yngelpleie, mens den tredje slipper mange larver som kan drive med strømmen i lang tid før de slår ned på bunnen. Artene er kort omtalt i kap. 2.

2 Materiale og metoder

Det er ikke praktisk mulig å måle transport eller migrasjon av små dyr og larver mellom fjorder eller fjordbassenger direkte. I tillegg til transport i vannmassene eller langs bunnen er larver avhengige av å finne et egnet habitat, og etablere seg i det nye området, slik at transport alene ikke gir noe gått mål på effektiv spredningsrate. Det er imidlertid godt samsvar mellom grad av isolasjon og genetiske forskjeller. Derfor kan genetisk differensiering mellom populasjoner gi et indirekte mål på grad av isolasjon (eller den inverse størrelsen 'konnektivitet'). Vi benyttet denne tilnærmingen ved å bruke mikrosatellitter hos tre bunnlevende evertebrater. Dette er genetiske markører som lett kan mutere ved under replikasjon av DNA, og som derfor regnes som hypervariable. Markørene består av korte, repeterende elementer (oftest to til fire baser per element) i DNA-tråden, og antall repeterende elementer kan detekteres gjennom måling av størrelsen på amplifiserte fragmenter. Amplifisering skjer gjennom «polymerase chain reaction» (PCR), som produserer mange kopier av det aktuelle fragmentet som inneholder en mikrosatellitt. Derved er det mulig å bruke tradisjonell sekvenseringsteknologi til å måle størrelse på fragmentene. Mikrosatellitt-markører forekommer vesentlig i ikke-kodende deler av DNA, og regnes derfor å være nøytrale i forhold til seleksjon. Dette er en forutsetning for å kunne benytte populasjonsgenetiske beregningsmetoder for å estimere genetisk diversitet og differensiering mellom populasjoner og/eller geografiske områder.

2.1 Studie organismer

Vi valgte tre bunnlevende evertebrater med svært ulike reproduksjonsstrategier, fra ekstrem yngelpleie uten fritt svømmende larver til 'broad-cast spawning' med et langvarig pelagisk larvestadium. Bakgrunnen for dette var en logisk antagelse om at arter med stor spredningsevne vil utvise langt mindre genetisk differensiering mellom fjorder og fjordbasseng. For arter med dårlig spredningsevne forventes derimot utveksling mellom adskilte habitater (fjordbasseng) å være begrenset, og sannsynligheten for genetisk differensiering mellom habitater derfor å være større. Nedenfor følger en kort omtale av artene.

2.1.1 *Munida sarsi*

Munida sarsi Huus, 1935 (norsk navn: muddertrollhummer, muddertrollkreps) er en dypvannsart som lever på bløt bunn, vanligvis under 70 m dyp (Figur 1). Eggene legges gjerne i november-desember, og hunnen bærer disse fram til klekking i mars-april. En enkelt hunn kan bære flere tusen egg. Ved klekking slippes larvene fritt. Disse gjennomlever fire fritt svømmende stadier, og larvene søker seg opp i de øvre 100 m i sjøen. Siden det kan ta 4-5 måneder før de slår seg ned på bunnen i august-september vil larvene derfor kunne drive langt av gårde med strømmer i de øvre vannlag.



Figur 1. *Munida sarsi* på fjordbunnen. Foto: H. Glenner.

2.1.2 *Diastylodes serratus*

Diastylodes serratus (G.O. Sars, 1865) har ikke noe norsk navn. Dette er et krepsdyr tilhørende Cumacea som er en gruppe av storkreps. Forslagsvis er denne gruppen kalt 'kommakreps' eller 'halekreps' på norsk. *D. serratus* er en ganske liten art (opp til 5 mm lang), og den lever også dypt på bløt bunn i fjorder og på kontinental-sokkelen. Dyrene er ganske dårlige svømmere, og forflytter seg bare over noen meter. Hanner synes imidlertid å være mer aktive svømmere enn hunner, trolig forbundet med søk etter make. Reproduksjonsbiologien er lite studert, og vi kjenner få detaljer om antall egg, utviklingstid og sesong for reproduksjonen. Hunnene bærer egg og larver til de slippes som små utgaver av de voksne, og de har dermed ikke noe frittsvevende stadium. Vi forventet derfor at spredningsevnen mellom fjorder og fjordbasseng er ganske liten hos denne arten.



Figur 2. *Diastylodes serratus*.
Foto: Universitetsmuseet i Bergen,
CC BY-NC-SA.

2.1.3 *Astarte sulcata*

Astarte sulcata (da Costa, 1778) er en musling i gruppen Carditoida. Slekten *Astarte* (på norsk ofte kalt *Astarte*-skjell) omfatter en rekke arter som kan være vanskelig å skille fra hverandre. *A. sulcata* blir opp til 30 mm lang, og lever på bløt bunn eller sandbunn fra 5 til 250 m dyp (og dypere), hvor dyrene ligger nedgravd like under overflaten med bare en sifon stikkende opp. Gjennom sifonen trekkes inn vann, og dyret lever av partiklene som følger med vannstrømmen. *A. sulcata* er vanlig i fjordene våre langs hele kysten.



Figur 3. *Astarte sulcata*. Foto: L.M. Hagalid Haug.

Astarte sulcata har yngelpleie. Hannene 'gyter' sperm fritt i vannet senhøstes eller tidlig vinter, mens eggene forblir hos hunnene også etter befruktning. Her utvikler de seg direkte til små muslinger uten noe frittlevende larvestadium, og disse slippes ved siden av mordyret. Dyrene kan bevege seg langsomt ved

hjelp av en fot som strekkes ut av skallet, men slik forflytning vil være svært begrenset. Vi forventet derfor at denne arten ville ha meget begrenset spredningsevne, fordi den helt mangler evne til å svømme, og avkommet må etablere seg nær foreldrene.

2.2 Utvikling av genetiske markører

Utvikling av mikrosatellitter krever omfattende sekvensering av DNA, og dette arbeidet ble satt ut til firma ecogenics GmbH i Sveits. DNA ekstrahert fra vev eller hele dyr ble anrikt for korte repeterende elementer, og anrikete DNA-fragmenter ble sekvensert på en Roche 454 plattform med GS FLX titanium reagenser. Dette resulterte i et stort antall (>100 000) sekvenser. Sekvenser av passende lengde ble gjennomført for repeterende motiv av egnet type, og der slike fantes ble det testet om det var mulig å finne primere for amplifisering. En rekke alternativer fragmenter (40-50) ble så testet for amplifisering, og deretter ble DNA fra 10 individer benyttet til amplifisering og analyse av fragmenter for å teste at variasjon faktisk finnes (polymorfisme-test). Ferdig leveranse fra ecogenics besto av primere for 10 mikrosatellitter, med DNA-sekvens og anbefalinger for amplifisering og analyse.

Komplikasjoner oppsto underveis. Basert på eldre data fra Førdefjorden antok vi at *Diastylodes biplicata* var lett å finne i Førdefjorden, og fikk utviklet mikrosatellitter for denne. Imidlertid viste det seg at bare *D. serratus* forekom i tilstrekkelig antall, og vi måtte da få utviklet et nytt sett mikrosatellitter for denne arten. Dette medførte en ny overraskelse, da mikrosatellitene viste stabil forekomst av mer enn to alleler (DNA-kopier), og dette kan bare bety at dyrene er polyploide, ikke diploide som 'normalt'. For laboratoriearbeidet medfører ikke dette noe problem, men det medfører en annen protokoll for skåring av alleler og analyse av data.

En oversikt over mikrosatellitt-loci utviklet i prosjektet finnes i Vedlegg A.

2.3 Innsamling av materiale

Materiale ble samlet inn ved flere tokt i Førdefjorden i 2011 og 2012. *Munida sarsi* ble samlet med en RP-slede, som fanger dyr i og nær overflaten av bunnsedimentene. Disse sledetrekkeene fanget også opp *Diastylodes serratus*. For å samle *Astarte sulcata* ble det benyttet en Agassiz-trål. Toktene til Førdefjorden gikk 13-16 mai 2011, 27-30 mars 2012 og 4-7 september 2012.

Supplerende materiale for *Munida sarsi* stammer fra tokt i Sognefjorden og Sognesjøen 1-5 november 2011, Hardangerfjorden 9-12 august 2011, Fensfjorden 26 februar 2011 og Korsfjorden 15 februar 2012. Tilsvarende ble *Astarte sulcata* -materialet supplert med innsamlinger fra Vatløstraumen utenfor Bergen 1 november 2012 og 2 oktober 2014, og prøver fra 9 stasjoner i Romsdalsfjorden samlet 12-13 oktober 2005. Et materiale av *Diastylodes serratus* fra Skagerak ble også stilt til rådighet av BIO, UiB.

Alt materiale ble konserverert i felt på 96 % etanol. Muslingskallene måtte åpnes for å sikre konservering av DNA.

2.4 Laboratoriearbeid

Fra hvert individ ble en bit vev dissekert ut, og DNA ble ekstrahert fra denne. I noen tilfeller ble hele individer av *Diastylodes serratus* benyttet hvis disse var svært små. DNA-ekstraksjon ble gjort vha. DNeasy® Blood and Tissue kit fra QIAGEN.

For å verifisere artsidentitet av *Astarte sulcata* og små individer av *Munida sarsi* ble et ca. 650 bp langt fragment av det mitokondrielle genet for cytochrome oxidase subunit I (COI) amplifisert i en 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) med universelle primere og sekvensert ved Sars International Centre for Marine Molecular Biology, UiB. DNA-sekvensene bekreftet riktig artsbestemmelse i alle tilfeller, og omtales derfor ikke videre her.

Fra DNA-ekstraktene ble hver mikrosatellitt-markør fra hvert individ amplifisert via PCR og spesifikke primere for hvert locus. Det ble så testet for PCR-produkt ved elektroforese på en agarose-gel. Noen markører viste seg vanskelige å amplifisere. Modifisering av PCR-protokollene bidro til å løse slike problemer i en del tilfeller, men enkelte markører gav så dårlige resultater at de måtte oppgis. For *Munida sarsi* kunne flere amplifiseringer kombineres i to multi-plex-reaksjoner i PCR, mens en markør her ble kjørt alene (single-plex). For *Astarte sulcata* og *Diastylodes serratus* ble alle PCR-reaksjoner kjørt i single-plex. Produktene ble testet for positiv amplifisering på agarose-gel.

Amplifiserte PCR-produkter ble analysert for størrelsesvariasjon (fragmentanalyse) på en ABI3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Alle markørene ble merket med en fluorescerende 'tag' på den ene primeren, slik at fire markører med ulik fluorescens kunne analyseres parallelt. En intern standard (GeneScan™500 LIZ™ Size standard, Applied Biosystems) ble benyttet for å kalibrere fragment-lengder. Fragmentanalysene ble utført hos Havforskningsinstituttet med Geir Dahle som ansvarlig.

2.5 Databearbeiding

Datafiler (kromatogrammer) fra analysene av *Munida sarsi* og *Astarte sulcata* ble importert i programmet Genemapper v. 4.0 (Applied Biosystems), hvor alle genotyper ble skåret. Fra Genemapper ble det så eksportert en tabell over alle individers genotyper på alle loci til Excel, og populasjonsgenetiske analyser ble for en del gjort i Excel med add-in programvare GenAlEx v. 6.501 (Peakall & Smouse 2012), og dels eksportert til annen programvare for bestemte typer analyser.

For *Diastylodes serratus* benyttet vi programmet Geneious v. 7.1.5 (Biomatters Ltd., New Zealand) for å skåre alleler. Denne arten viste seg å være polyploid, med opptil fire alleler på ett locus. Det er da ikke mulig å benytte 'normale' analytiske metoder, som er basert på kjent nedarving av ett allel fra hver av foreldrene. I vårt tilfelle var det ikke mulig å skåre antall kopier av hvert allel. I stedet ble hvert allel skåret som tilstede eller ikke (presence/absence). Dette er samme metode som benyttes for markører med ukjent dominans, som 'amplified fragment length polymorphism' (AFLP) markører. Etter eksport av data fra Geneious til Excel ble data derfor konvertert til 1 eller 0, og analysert som dominante markører i ukjent fase.

Videre bearbeiding av data for *Munida sarsi* og *Astarte sulcata* omfattet kontroll for loci under seleksjon med Lositan (Antao 2008), og en sjekk for såkalte null-alleler med to ulike tilnærminger i MicroChecker v. 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) og i Genepop v. 4.1.4 (Rousset 2008). Videre bearbeiding er beskrevet i resultat-kapitlet.

Det finnes en rekke tilnærminger for å beregne genetisk differensiering mellom populasjoner. Disse er basert på ulike antagelser og modeller for utveksling av individer og gener, og for hvordan mutasjoner oppstår i de genetiske markørene. I litteraturen har såkalt F-statistikk etter Wright (1943) lenge vært dominerende, med estimatoren F_{ST} som mål på differensiering mellom populasjoner. Andre analoge estimatorene er senere utviklet for å omgå begrensninger som ligger i forutsetningene for F-statistikk. For mikrosatellitter brukes f. eks. R_{ST} , som er basert på en spesifikk mutasjonsmodell for repeterende elementer (Slatkin 1995). Jost's D_{EST} er designet for å omgå flere problemer med F_{ST} (Jost 2008), og flere andre metoder benyttes også. Fordeler og problemer med de ulike metodene er stadig omdiskutert. Her presenteres F_{ST} og D_{EST} (eller G'_{ST}), som alternativer anbefalt av Meirmans & Hedrick (2011). For *Diastylodes serratus*, som er analysert for dominante markører, måtte en annen analog estimator benyttes. Denne kalles Φ_{PT} .

Felles for estimatorene diskutert over er at de kan beregnes innenfor et rammeverk som kalles 'Analysis of molecular variance' (AMOVA) etter Excoffier et al (1992). Denne tilnærmingen fungerer analogt med tradisjonell 'Analysis of variance' (ANOVA) i parametriske statistikk, og gjør det mulig å tilskrive genetisk variasjon til flere nivåer i et hierarki, f. eks. mellom regioner, mellom populasjoner innen regioner, og innen populasjoner.

3 Resultater

I det følgende gis en kortfattet beskrivelse av resultater for de tre artene som ble undersøkt i prosjektet.. Hovedfokus her er lagt på genetisk differensiering mellom populasjoner, mens en rekke aspekter av genetisk diversitet i liten grad er tatt med. En fullstendig redegjørelse for analyser utført på *Munida sarsi* finnes i Birkeland (2013), og tilsvarende vises det til Haug (2014) for detaljer om analyser av *Astarte sulcata*.

3.1 *Munida sarsi*

I tillegg til materiale fra Førdefjorden er analysene basert på dyr samlet på en rekke stasjoner på Vestlandet (**Figur 4**). Antall individer fra ulike stasjoner varierte mellom 11 og 85 (Tabell 1).



Figur 4. Hovedstasjoner for innsamlet materiale av *Munida sarsi*. Fra Birkeland (2013). Kartgrunnlag fra norgeskart.no.

Tabell 1. Stasjoner for innsamling av materiale til analyse av *Munida sarsi*.

Kode, Fig. 4	Stasjon	Antall individer
F1	Førdefjorden, indre basseng	85
F1	Førdefjorden, midtre basseng	69
F1	Førdefjorden, midtre basseng	50
F2	Sognesjøen	29
F3	Fjærlandsfjorden	17
F4	Fensfjorden	28
F5	Korsfjorden	43
F6	Hardangerfjorden	11
Totalt		332

Brukbare resultater ble generert for 9 av 11 utviklede mikrosatellitt-loci. To loci måtte kuttes ut av tekniske årsaker. Antall alleler (genetiske varianter) varierte fra 7 til 43 per locus, og totalt fant vi 107 alleler over de 9 loci. Basert på heterozygositet ble avvik fra Hardy-Weinberg likevekt testet i GenALex, og

statistisk signifikante avvik forekom på 7 loci på en eller flere stasjoner. Avvikene skyldtes vesentlig underskudd av heterozygoter i forhold til forventning basert på allelfrekvensene. Resultatene ble også testet for tegn på skåringsfeil og forekomst av null-alleler (dette er allel-varianter som av tekniske årsaker ikke amplifiserer i PCR-reaksjonen, og derfor ikke detekteres). Tegn til at null-alleler forekom ble påvist for fire loci, men estimerte frekvenser av disse var så lave at korreksjoner ikke ble vurdert som nødvendig eller meningsfylt. En analyse av 'linkage disequilibrium' viste at to loci syntes å være koblet i variasjon. Dette indikerer at de befinner seg nær hverandre på et kromosom, og derfor har stor sannsynlighet for å nedarves sammen gjennom en reproduksjonssyklus. En forutsetning for å bruke genetiske loci i populasjonsgenetiske analyser er uavhengighet i nedarving (ingen kobling), og ett av disse loci måtte derfor elimineres fra videre analyser. Videre ble alle loci testet for om de var nøytrale i forhold til seleksjon. Igjen måtte vi eliminere ett locus fra datasettet, og det gjestod dermed 7 loci for videre analyse av genetisk differensiering.

Estimater av differensiering mellom ulike populasjoner lå lavt i alle parvise sammenligninger, og ingen av de parvise testene viste signifikant avvik fra null. Dette gjaldt for begge estimatorene F_{ST} (Tabell 2) og D_{EST} (Tabell 3).

Tabell 2. Estimater av genetisk differensiering (F_{ST}) basert på 7 mikrosatellitter hos *Munida sarsi*. F_{ST} estimater under diagonalen, og p-verdier basert på 999 permutasjoner over diagonalen.

	FørdeI	FørdeM	FørdeO	Fensfj.	Sognesj.	Fjær.	Korsfj.	Hard.
FørdeI	-	0.294	0.133	0.672	0.439	0.806	0.224	0.799
FørdeM	0.004	-	0.158	0.307	0.425	0.226	0.462	0.935
FørdeO	0.005	0.006	-	0.894	0.140	0.805	0.801	0.595
Fensfj.	0.006	0.007	0.005	-	0.503	0.960	0.432	0.824
Sognesj.	0.007	0.007	0.009	0.010	-	0.694	0.355	0.990
Fjær.	0.008	0.010	0.008	0.008	0.012	-	0.771	0.919
Korsfj.	0.005	0.005	0.005	0.008	0.008	0.009	-	0.751
Hard.	0.011	0.010	0.014	0.014	0.011	0.015	0.013	-

Tabell 3. Estimater av genetisk differensiering (D_{EST}) basert på 7 mikrosatellitter hos *Munida sarsi*. D_{EST} estimater under diagonalen, og p-verdier basert på 999 permutasjoner over diagonalen.

	FørdeI	FørdeM	FørdeO	Fensfj.	Sognesj.	Fjær.	Korsfj.	Hard.
FørdeI	-	0.292	0.124	0.671	0.475	0.806	0.216	0.834
FørdeM	0.002	-	0.156	0.308	0.481	0.437	0.463	0.953
FørdeO	0.006	0.006	-	0.898	0.155	0.806	0.804	0.654
Fensfj.	-0.005	0.004	-0.013	-	0.502	0.962	0.433	0.849
Sognesj.	0.000	0.000	0.012	-0.002	-	0.660	0.378	0.978
Fjær.	-0.012	0.001	-0.014	-0.028	-0.010	-	0.775	0.916
Korsfj.	0.005	0.000	-0.007	0.001	0.002	-0.011	-	0.793
Hard.	-0.020	-0.029	-0.010	-0.027	-0.046	-0.040	-0.019	-

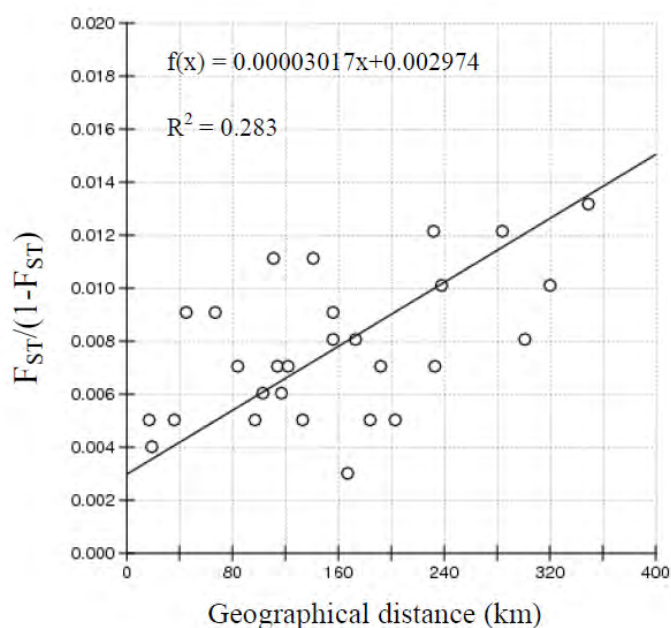
Vi testet også for differensiering med materialet gruppert i tre regioner (Nord: tre basseng i Førdefjorden; Midt: Fjærlandsfjorden, Sognesjøen og Fensfjorden; Sør: Korsfjorden og Hardangerfjorden). Heller ikke mellom disse gruppene ble det funnet noen statistisk signifikant differensiering i genetisk variasjon.

Tabell 4. Hierarkisk AMOVA av genetisk differensiering mellom regioner, mellom populasjoner innen regioner, og blant individer innen populasjoner hos *Munida sarsi*. Basert på 7 mikrosatellitter. Høyre kolonne merket p angir p-verdi basert på 999 permutasjoner i GenAlEx.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Mean squares	Variance component	% total	F - statistics	p
Among regions	2	4.61	2.30	0	0	$F_{RT}=-0.001$	0.720
Among pop. within regions	5	13.23	2.65	0	0	$F_{SR}=0$	0.419
Among ind. within pop.	656	1719.02	2.62	2.62	100	$F_{ST}=-0.001$	0.621

AMOVA ble gjort på flere måter. Tabell 4 viser en F_{ST} -basert analyse, som igjen indikerer null differensiering mellom regioner og mellom populasjoner. All genetisk variasjon ligger etter denne analysen på individ-nivå, uten noen geografisk struktur. En alternativ analyse basert på R_{ST} (som forutsetter en bestemt mutasjonsmodell) gav imidlertid signifikant variasjon både mellom regioner og mellom populasjoner innen regioner. Imidlertid er det tvilsomt om mutasjonsmodellen kan være gyldig for våre markører, så dette resultatet tillegges lite vekt.

En annen type tilnærming til geografisk differensiering er kjent som 'Isolation by Distance' (IBD). Dette er en regresjonsanalyse mellom geografisk avstand og genetisk forskjell mellom individer eller populasjoner. En slik analyse for *Munida sarsi* (Figur 5) viste en klar tendens til sammenheng, selv om korrelasjonen var marginalt signifikant ($p=0,0593$).



Figur 5. Korrelasjon mellom geografisk avstand og genetisk differensiering hos *Munida sarsi*. Korrelasjonen har en p-verdi på 0,0593. Fra Birkeland (2013).

For *Munida sarsi* synes genetisk differensiering å være meget svak selv over store geografiske avstander. Dette antas å henge sammen med meget god spredningsevne, både mellom kysten og fjordene, og mellom bassenger innen fjorder.

3.2 Astarte sulcata

Materiale til genetiske analyser ble samlet inn i Førdefjorden (indre, midtre og ytre del), og i tillegg fra fire stasjoner i Vatilestraumen (**Figur 6**). Et tidligere innsamlet materiale fra Møre og Romsdal (Rydland Olsen et al. 2009) ble også inkludert. Det sistnevnte materialet var fordelt på mange stasjoner med relativt få individer på mange av stasjonene (Tabell 5).



Figur 6. Hovedstasjoner for innsamlet materiale av *Astarte sulcata*. Fra Haug (2015). Kartgrunnlag fra google.maps.com.

Tabell 5. Stasjoner for innsamling av materiale til analyse av *Astarte sulcata*. Høyre kolonne viser gruppering av enkeltpopulasjoner til regioner.

Region	Stasjon	Antall individer	Gruppering
Førdefjorden	Førdefjorden, indre basseng	29	Førde I
Førdefjorden	Førdefjorden, midtre basseng	26	Førde M
Førdefjorden	Førdefjorden, midtre basseng	41	Førde Y
Møre	Freifjorden	15	Møre 1
Møre	Kvernesfjorden	3	Møre 1
Møre	Jaaholmen	2	Møre 1
Møre	Galten	6	Møre 1
Møre	Julsundet	10	Møre 2
Møre	Julneset	11	Møre 2
Møre	Romsdalsfjorden 1	4	Møre 3
Møre	Romsdalsfjorden 2	15	Møre 3
Vatilestraumen	Vatilestraumen 1	56	Vatle
Vatilestraumen	Vatilestraumen 2	56	Vatle
Vatilestraumen	Vatilestraumen N	55	Vatle
Vatilestraumen	Vatilestraumen S	41	Vatle
Totalt		370	

10 mikrosatellitt-loci ble utviklet for *A. sulcata*. For ett av disse lyktes vi ikke med å få til akseptabel amplifisering. For de 9 gjenværende markører fant vi fra 11 til 27 alleler, med totalt 106 alleler summert over alle 9 loci. Analyser av allelfrekvenser viste betydelige avvik fra Hardy-Weinberg likevekt, og tester for null-alleler indikerte at slike var forklaringen på mye av disse avvikene. Allelfrekvenser ble derfor justert for estimerte null-allel forekomster i MicroChecker, og det korrigerte datasettet ble benyttet i videre analyser. Test for loci under seleksjon i Lositan førte til eliminering av ett locus, og nok et locus måtte elimineres fordi det viste kobling (linkage) med et annet. Vi hadde altså 7 loci igjen til videre analyser av differensiering.

Analyser ble gjennomført med ulike grupperinger av stasjoner i regioner. Her presenteres først regioner som gruppert i Tabell 5: Førde I, Førde M, Førde Y, Møre 1, Møre 2, Møre 3 og Vatile. Estimer av genetisk differensiering mellom populasjoner lå stort sett høyere enn for *Munida*, men det var likevel bare to av enkelt-verdiene for både F_{ST} og G''_{ST} som var signifikant forskjellige fra null når kritisk p-verdi var justert for flere sammenligninger (Tabell 6 og Tabell 7). I begge tilfelle var det Vatilestraumen som var forskjellig fra Førde Y og Møre 2. Flere p-verdier lå lavere enn 'normal' kritisk verdi for enkelt-tester, f. eks. Førde I sammenlignet med Førde M (Tabell 6 og Tabell 7).

Tabell 6. Parvise tester for genetisk differensiering mellom populasjoner av *Astarte sulcata*, basert på F_{ST} -estimer (vist under diagonalen). p-verdier basert på 999 permutasjoner er vist over diagonalen, med verdier signifikant forskjellige fra null uthevet. Kritisk p-verdi er satt til 0.024 basert på False Discovery Rate (6 tester for hver populasjon).

	Førde I	Førde M	Førde Y	Møre-1	Møre-2	Møre-3	Vatile
Førde I		0.043	0.561	0.221	0.111	0.913	0.051
Førde M	0.022		0.313	0.022	0.022	0.136	0.064
Førde Y	0.011	0.014		0.038	0.054	0.166	0.013
Møre-1	0.018	0.026	0.020		0.154	0.150	0.027
Møre-2	0.024	0.031	0.023	0.028		0.495	0.002
Møre-3	0.012	0.023	0.019	0.024	0.023		0.335
Vatile	0.011	0.012	0.009	0.013	0.021	0.012	

Tabell 7. Parvise tester for genetisk differensiering mellom populasjoner av *Astarte sulcata*, basert på G''_{ST} -estimer (vist under diagonalen). p-verdier basert på 999 permutasjoner er vist over diagonalen, med verdier signifikant forskjellige fra null uthevet. Kritisk p-verdi er satt til 0.024 basert på False Discovery Rate (6 tester for hver populasjon).

	Førde I	Førde M	Førde Y	Møre-1	Møre-2	Møre-3	Vatile
Førde I		0.044	0.553	0.248	0.210	0.926	0.048
Førde M	0.048		0.311	0.025	0.041	0.150	0.063
Førde Y	-0.023	-0.004		0.056	0.124	0.172	0.013
Møre-1	-0.001	0.063	0.037		0.171	0.134	0.056
Møre-2	0.005	0.062	0.031	0.026		0.570	0.004
Møre-3	-0.088	0.016	0.012	0.015	-0.055		0.339
Vatile	0.023	0.023	0.028	0.021	0.065	-0.005	

En hierarkisk AMOVA for hele datasettet (Tabell 8) indikerte imidlertid statistisk signifikant differensiering mellom regioner og mellom populasjoner, med en total F_{ST} på 0,037. Dette tilsvarer at 3,7 % av genetisk variasjon i datasettet skyldes forskjeller mellom regioner og populasjoner, og det meste av dette (3,4 %) lå mellom populasjoner.

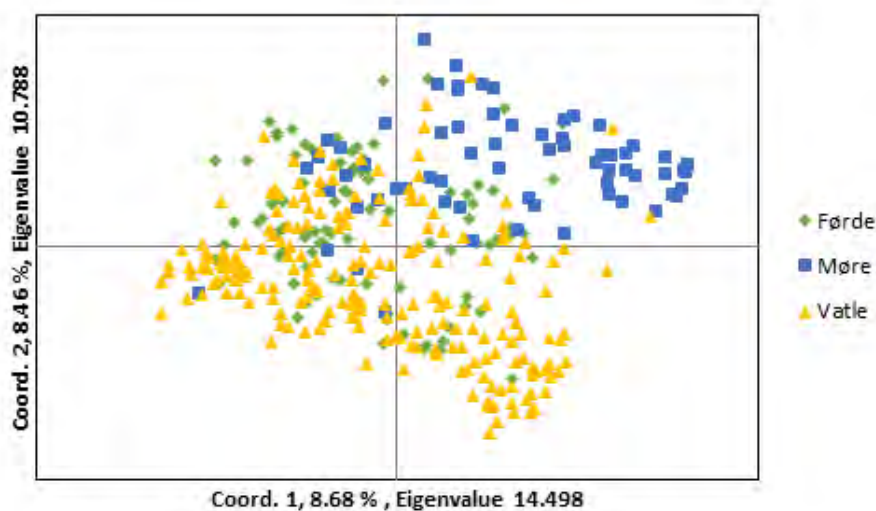
Tabell 8. Hierarkisk AMOVA av genetisk differensiering mellom regioner, mellom populasjoner innen regioner, og blant individer innen populasjoner hos *Astarte sulcata*. Basert på 7 mikrosatellitter. Kolonne merket P angir p-verdi basert på 999 permutasjoner i GenAlEx.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	Stat	Value	p
Among Regions	2	22.595	11.298	0.010	0.4 %	F _{rt}	0.004	0.002
Among Pops	7	69.059	9.866	0.095	3.3 %	F _{sr}	0.034	0.001
Within Pops	730	2005.931	2.748	2.748	96.3 %			
Total	739	2097.585		2.853	100.0 %	F _{st}	0.037	0.001

Tilsvarende AMOVA-analyser ble utført separat for variasjon innen de ulike regionene hver for seg, og viste signifikant genetisk segregering innen alle tre regioner (Tabell 9). Populasjonene var mest distinkte i Vatlestraumen, og minst i Førdefjorden.

Tabell 9. Genetisk differensiering mellom regioner (F_{ST}) estimert ved AMOVA innen hver av tre regioner analysert separat. Kolonne merket P angir p-verdi basert på 999 permutasjoner i GenAlEx.

Region	F_{ST}	P
Møre	0.035	0.001
Førdefjorden	0.007	0.012
Vatlestraumen	0.047	0.001



Figur 7. 'Principal coordinates' analyse (PCoA) av genetisk variasjon hos *Astarte sulcata*, basert på 9 mikrosatellitter, og gruppert i tre hovedområder (Møre, Førdefjorden og Vatlestraumen). Hvert punkt representerer ett individ, fargekodet for de tre områdene. De to første aksene er vist, med eigenvalue og andel forklaring av genetisk variasjon.

To mikrosatellitt-markører som ble kuttet ved beregning av differensieringsestimatene over viste større forskjell mellom regionene. Dette er illustrert i **Figur 7**, som viser en ‘Principal Coordinates’ analyse. Dette er en metode for grafisk å sammenfatte mange-dimensjonale data, her vist med de to aksene som fanger opp mest mulig av variasjonen. I dette tilfellet blir ca. 15 % av genetisk variasjon synlig med de to viktigste aksene, og fordelingen av punktene viser tydelig forskjell spesielt mellom Møre og Vatelestraumen. Denne regionale differensieringen skyldes først og fremst et locus som synes å være under seleksjon, og derfor måtte elimineres fra andre analyser. Forholdet illustrerer at vi kan ha en geografisk struktur i genetisk variasjon som ikke reflekteres i formell analyse av differensiering mellom populasjoner og regioner.

Vi analyserte også for ‘Isolation by Distance’, men fant ingen statistisk signifikant sammenheng mellom geografisk avstand og genetisk differensiering. I denne analysen var bare 7 markører med, i motsetning til PCoA-analysen beskrevet over som var basert på alle 9 markører.

De fire stasjonene i Vatelestraumen viste større differensiering enn i Førdefjorden og på Møre. Disse stasjonene ligger ganske nær hverandre (mellom 0,25 og 1,8 km distanse). Innbyrdes differensiering mellom noen stasjoner var uventet høy, mens andre stasjoner ikke var signifikant differensiert (Tabell 10). Dette korrelerte ikke med geografisk avstand. F. eks var den geografiske avstanden mellom Vatile 1 og Vatile N bare 250 m, mens genetisk differensiering mellom stasjonene lå høyt (0,062).

Tabell 10. Genetisk differensiering mellom fire stasjoner i Vatelestraumen, estimert som G''_{ST} (under diagonalen). p-verdier basert på 999 permutasjoner i GenAlEx over diagonalen.

	Vatile 1	Vatile 2	Vatile N	Vatile S
Vatile 1	-	0.397	0.001	0.013
Vatile 2	-0.006	-	0.360	0.006
Vatile N	0.062	-0.001	-	0.108
Vatile S	0.047	0.066	0.045	-

3.3 Diastylodes serratus

I tillegg til materiale fra de tre bassengene i Førdefjorden inkluderte vi dyr fra UiB sin tidligere prøvetaking i Skagerak (Tabell 11).

Tabell 11. Stasjoner for innsamling av materiale til analyse av *Diastylodes serratus*.

Stasjon	Antall individer
Førdefjorden, indre basseng	173
Førdefjorden, midtre basseng	110
Førdefjorden, ytre basseng	100
Skagerak	41
Totalt	424

For *D. serratus* ble det utviklet 11 mikrosatellitter. Allerede under utviklingen av disse vist det seg at mer enn to alleler ofte forekom på flere loci, og at arten derfor må være polyploid (ha mer enn to kromosomer og dermed DNA-kopier). En av disse markørene var vanskelig å amplifisere, og videre arbeid ble basert på 10 loci. Fordi det var usikkert hvor mange gen-kopier (alleler) dyrene faktisk har måtte vi betrakte markørene som dominante (enten til stede eller mangler). Med dominante markører kunne vi se bort fra potensielle problemer med null-alleler og Hardy-Weinberg likevekt. Datasettet besto av mange alleler, men

mange av disse var ikke informative siden de bare forekom i enkelt-individer. Ved å eliminere disse sto vi igjen med 120 alleler for videre analyser. For dominante markører benyttes estimatoren Φ_{PT} , som en analog til F_{ST} .

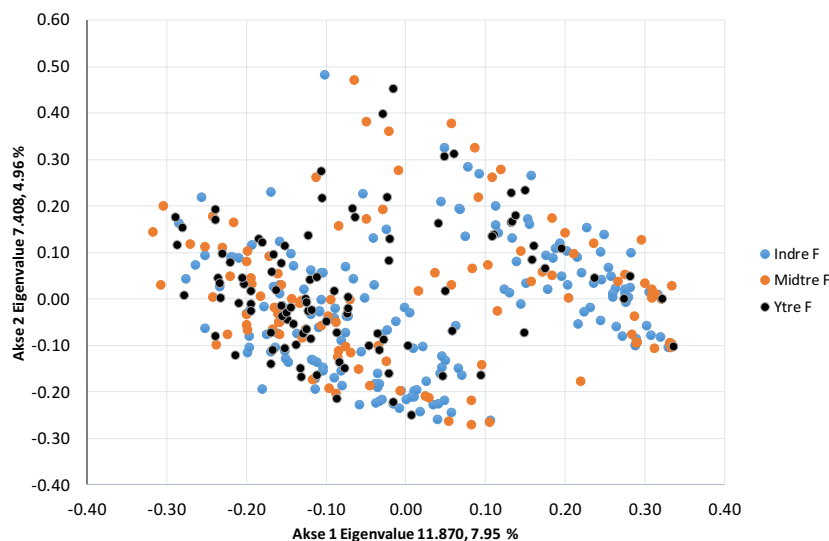
Genetisk differensiering mellom populasjoner ble estimert via AMOVA (Tabell 12). Basert på alle fire populasjoner ble genetisk differensiering (Φ_{PT}) estimert til 0,026 med en assosiert p-verdi på 0,001 (999 permutasjoner i GenAlEx). En tilsvarende analyse av de tre bassengene i Førdefjorden ga omtrent samme resultat, med Φ_{PT} på 0,028 ($p=0,001$). Av de tre bassengene i Førdefjorden skilte midtre og indre basseng seg markert fra det ytre, men var mindre ulike innbyrdes. Alle de tre bassengene var imidlertid signifikant differensiert fra hverandre (Tabell 13).

Tabell 12. Hierarkisk AMOVA av genetisk differensiering mellom populasjoner og blant individer innen populasjoner hos *Diastylodes serratus*. Basert på 10 mikrosatellitter analysert som dominante alleler. Φ_{PT} estimert til 0,026 med en assosiert p-verdi på 0,001 (999 permutasjoner i GenAlEx).

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Populations	3	79.711	26.570	0.194	3 %
Within Populations	420	3097.176	7.374	7.374	97 %
Total	423	3176.887		7.568	100 %

Tabell 13. Parvis test for genetisk differensiering hos *Diastylodes serratus* mellom ytre, midtre og indre bassenger i Førdefjorden. Basert på 10 mikrosatellitter analysert som dominante alleler. Φ_{PT} -verdier under diagonalen, og p-verdier basert på 999 permutasjoner i GenAlEx over diagonalen.

	Indre	Midtre	Ytre
Indre	-	0.001	0.001
Midtre	0.018	-	0.001
Ytre	0.049	0.047	-



Figur 8. 'Principal coordinates' analyse (PCoA) av genetisk variasjon hos *Diastylodes serratus* i Førdefjorden. Hvert punkt representerer ett individ, fargekodet for de tre stasjonene. De to første aksene er vist, med eigenvalue og andel forklaring av genetisk variasjon.

En ‘Principal Coordinates’ analyse av data fra Førdefjorden (**Figur 8**) visualiserte bare 10 % av genetisk variasjon i de to første aksene, på tross av relativt markert differensiering mellom de tre bassengene. Et noe utydelig mønster i figuren er at de fleste individer fra Førdefjordens ytre basseng ligger til venstre i plottet, mens dette i mindre grad gjelder for individer fra de andre to bassengene.

4 Diskusjon

Kapittel 3 viser de viktigste resultatene av arbeidspakke 4. Materialet er også analysert på flere andre måter, f. eks. med programmet Structure (Pritchard m.fl. 2000), som er basert på en Bayesisk algoritme for å estimere hvordan populasjoner er genetisk strukturert i sub-populasjoner. Disse resultatene har selvsagt faglig interesse, men er ikke inkludert her siden de ville komplisere presentasjon av resultatene. Structure-analysene gir ikke noen stringent test av hypotesene, og endrer heller ikke konklusjoner av undersøkelsene.

Estimatene av genetisk differensiering som er påvist for *Astarte sulcata* og *Diastylodes serratus* kan synes lave, siden de forklarer så liten del av den genetiske variasjonen. Imidlertid er den viktigste observasjonen at differensieringene er statistisk signifikante. En rekke studier har vist tilsvarende subtile forskjeller basert på mikrosatellitter og andre genetiske markører. Et eksempel er amerikansk hummer (*Homarus americanus*) på østkysten av Nord-Amerika (Benestan m.fl. 2015). Denne arten har et frittstående pelagisk larvestadium og god spredningsevne. Tidligere studier (Kenchington m. fl. 2009) påviste svak eller ingen genetisk struktur med et sett av 13 mikrosatellitter, med meget lave F_{ST} -verdier. Med en annen type markører kalt ‘Single Nucleotide Polymorphisms’ (SNP) kunne et langt større antall markører anvendes (etter eliminering av loci under seleksjon og koblete loci mer enn 8000 SNPer). Dette datasettet ga betydelig mer robuste konklusjoner om signifikant differensiering mellom de fleste populasjoner som ble undersøkt. Imidlertid var F_{ST} -verdiene like lave som i tidligere studier, og genetisk variasjon som kunne tilskrives forskjeller mellom regioner og populasjoner lå til sammen under 0,3 %, noe som tilsvarer våre resultater for *Munida sarsi*. Likevel var altså differensieringen høyst signifikant, og viser at spredning av larver faktisk er begrensende for genetisk utveksling. Benestan m. fl. (2015) påviste også en tydelig ‘Isolation by Distance’ i datasettet. Flere andre undersøkelser basert på et stort antall SNPer har vist lignende resultater, bl. a. på mennesker (Leslie m.fl. 2015).

En metodisk viktig konklusjon ut fra våre resultater og publisert litteratur er at det er viktig med mange markører for å kunne detektere subtile genetiske forskjeller mellom populasjoner. Utvikling av SNPer er basert på massiv sekvensering og bioinformatiske verktøy, og er blitt atskillig lettere tilgjengelig og mindre kostbart de siste årene. For nye undersøkelser rundt samme problemstilling anbefales derfor å satse på flere markører, og kanskje færre individer av hver art. 30 individer vil vanligvis være nok til å representere genetisk diversitet i en populasjon (Hale m. fl. 2012).

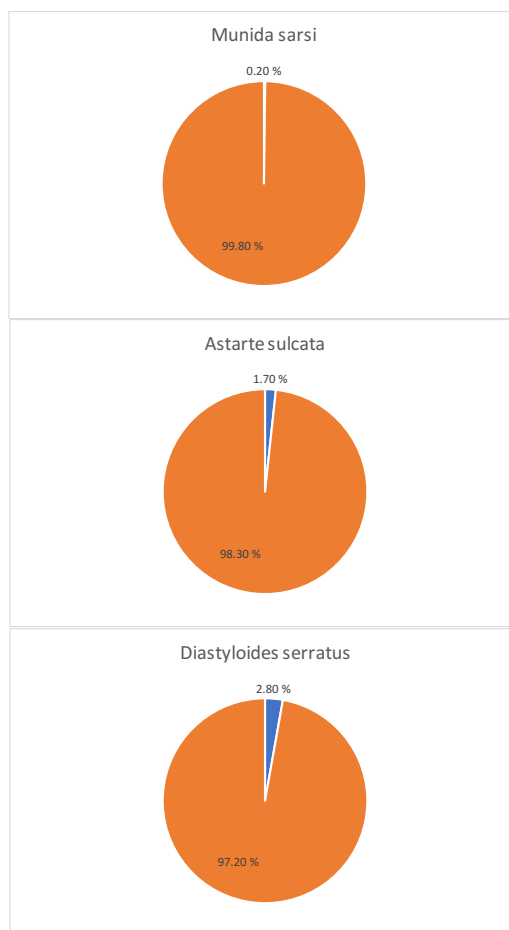
Et viktig og uavklart aspekt er innsamling av materiale i forhold til hvor flekkvis forekomsten av artene er på sjøbunnen. Våre ‘populasjoner’ kan tenkes å være sammensatt av dyr fra flere mindre habitatflekker, siden redskapen som brukes trekkes over bunnen ofte over flere hundre meter. I tillegg har vi måttet slå sammen materiale fra flere slike trekk til en prøve. Dette er spesielt merkbart for *Astarte sulcata*, hvor vi hadde størst problemer med å få tak i nok individer for analysene. For regionen Møre måtte vi også slå sammen materiale fra flere stasjoner med noe avstand i mellom. Påvisning av betydelig differensiering mellom nærliggende stasjoner i Vattestraumen indikerer at dette problemet er reelt for noen arter, og bruk av mer presise, men arbeidsintensive innsamlingsredskaper, som grabb og/eller corer, blir derfor en klar anbefaling fra dette prosjektet. For *Astarte* kan det tenkes at den lever i ganske små flekker av egnet habitat.

Dersom flere distinkte sub-populasjoner blir slått sammen til én prøve kan dette føre et tilsynelatende underskudd av heterozygote individer, selv om dette ikke er tilfelle i hver sub-populasjon (såkalt Wahlund-

effekt). Både for *Astarte sulcata* og *Munida sarsi* fant vi underskudd av heterozygoter, og dette er svært vanlig blant marine evertebrater. Imidlertid kan også null-alleler medføre det samme forholdet, og for *Astarte* ble det nødvendig å korrigere for dette. Problemet med potensielle Wahlund-effekter understreker igjen viktigheten av en god strategi og metode for innsamling av dyr, tilpasset de ulike artenes bevegelses-evne. Vi antar at problemet er mindre for *Diastylodes* og særlig *Munida*, som har større mobilitet enn *Astarte*.

Astarte-muslinger har yngelpleie og er lite mobile, men hannen slipper spermier fritt i vannet. Dersom spermene kan overleve over noe tid kan de tenkes å bidra til å viske ut genetisk differensiering. Hvor lenge spermene faktisk kan overleve er ukjent, men slik kunnskap for denne arten og andre med lignende reproduksjonsstrategi ville være svært relevant for vår problemstilling.

En direkte sammenligning mellom de tre artene vi har studert er bare mulig for de tre bassengene i Førdefjorden (**Figur 9**). Noe uventet fant vi større differensiering hos *Diastylodes serratus* enn hos *Astarte sulcata*. Hovedpoenget er likevel at de to artene med yngelpleie viste signifikant differensiering, mens arten med et langlivet pelagisk larvestadium ikke viste dette, som illustrert tydeligere i **Figur 10**.

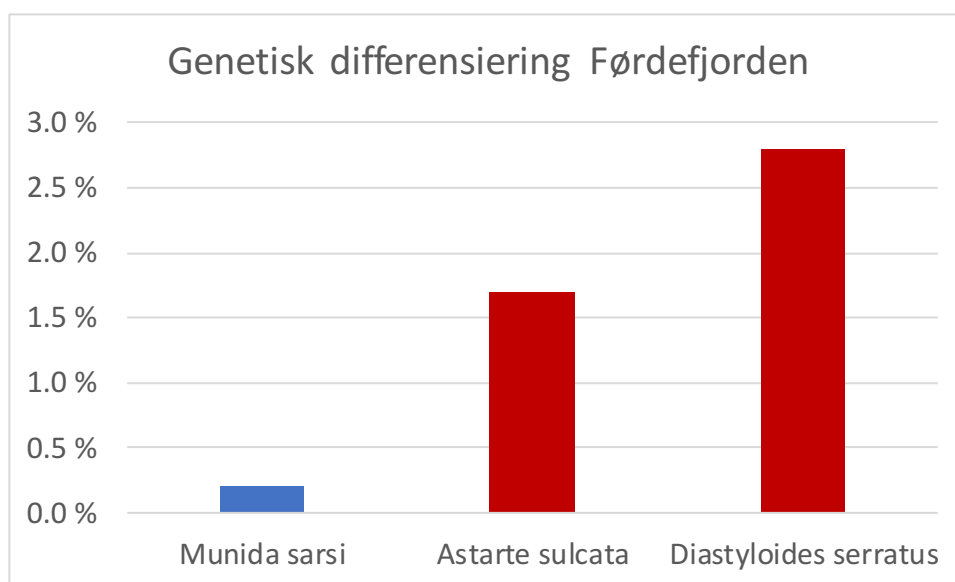


Figur 9. Andel av genetisk variasjon knyttet til ulike bassenger i Førdefjorden (blått segment) hos tre bunnlevende evertebrater.

Med henvisning til hypotesene vi arbeidet ut fra kan vi konkludere med å forkaste den første null-hypotesen om at arter med yngelpleie ikke viser genetisk differensiering, og slå fast at slik differensiering finnes både mellom fjorder og mellom bassenger innen fjorder. Imidlertid synes genetisk differensiering å være variabel og i mange tilfeller ganske subtil.

Vår andre null-hypotese om at arter som spres som pelagiske larver ikke viser genetisk differensiering kan derimot ikke forkastes ut fra våre resultater.

For å kunne vurdere om noen bassenger innen en fjord faktisk har 'sink' populasjoner av arter med dårlig spredningsevne er det nødvendig å estimere populasjonsstørrelse. Vi har ingen slike estimater for artene som er studert her, men blant de tre skilte *Astarte sulcata* seg ut med lave antall i innsamlingen. Eventuelle videre studier i denne retningen bør inkludere prøvetaking som er egnet for å estimere bestander.



Figur 10. Andel av genetisk variasjon knyttet til ulike bassenger i Førdefjorden hos tre bunnlevende evertebrater. De røde søylene indikerer statistisk signifikant differensiering, mens blå søyle ikke er signifikant forskjellig fra null.

5 Konklusjon

Prosjektet har påvist genetisk differensiering mellom fjorder, og mellom bassenger innen fjorder, for to marine evertebrater som mangler effektive spredningsstadier i sin livssyklus. For en av artene fant vi også ett tilfelle av markant differensiering mellom nærliggende stasjoner innen samme basseng. En tredje marin art med langvarig pelagisk larvestadium i sin livssyklus viste ingen signifikant genetisk differensiering selv over større avstander langs kysten av Vest-Norge.

Deponering av avgangsmasser på bunnen av en fjord kan utvilsomt utrydde lokale populasjoner av bunnlevende arter med begrenset mobilitet. Artenes spredningsevne vil ha betydning for rekolonisering etter at deponering er avsluttet, men kan også ha betydning for små og perifere populasjoner i andre bassenger i samme fjord. Dette vil først og fremst avhenge av de lokale populasjonenes størrelse og reproduksjonsrate, siden små bestander er mer utsatt for å dø ut som følge av tilfeldige svingninger i tetthet. Resultatene gir grunnlag for å anbefale at aktuelle deponiområder utredes for mulig funksjon som 'kildepopulasjon' for tilgrensende deler av fjordsystemet. Dette innebærer kartlegging av aktuelle dypvannsarter med yngelpleie i tilgrensende fjordbasseng, og estimering av populasjonsstørrelse hos disse med formål å vurdere risiko for lokal ekstinksjon når eventuelle 'kildepopulasjoner' utryddes.

6 Litteratur

- Antao T, Lopes A, Lopes R, Beja-Pereira A, Luikart G. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. *BMC Bioinformatics*, 9: 323.
- Benestan L, Gosselin T, Perrier C, Sainte-Marie B, Rochette R, Bernatchez L. 2015. RAD genotyping reveals fine-scale genetic structuring and provides powerful population assignment in a widely distributed marine species; the American lobster (*Homarus americanus*). *Molecular Ecology*. 24: 3299-3315.
- Birkeland, Ina Bakke. 2013. Population genetic studies of *Munida sarsi* Huus, 1935 in Norwegian fjord systems. Master thesis in Marine Biology, University of Bergen. 134 pp.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*: 131, 479–491.
- Hale ML, Burg TM, Steeves TE. 2012. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS one*, 7, e45170.
- Haug, Lisa Maria Hagalid. 2015. Population genetic studies of *Astarte sulcata* (da Costa, 1778) along the coast of Western Norway. Master thesis in Marine Biology, University of Bergen. 129 pp.
- Jost L. 2008. G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17: 4015-4026.
- Kenchington EL, Harding GC, Jones MW, Prodöhl PA. 2009. Pleistocene glaciation events shape genetic structure across the range of the American lobster, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology*: 18, 1654–1667.
- Leslie L, Winney B, Hellenthal G, Davison D, Boumertitt A, Day T, Hutnik K et al. 2015. The fine-scale genetic structure of the British population. *Nature*, 519: 309-314.
- Meirmans PG, Hedrick PW. 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11: 5-18.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-59.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete re - implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MicroChecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.

Vedlegg A. Mikrosatellitt loci

Munida sarsi

Locus	Primer sequences 5'→3'	Repeat type	Size bp	No. of alleles
Munsar_01247	F: ACTGACATGGAATTTAACAGGAGG R: TCCTCGTCCTCTTCCCAC	(GAG)7	127	3
Munsar_02855	F: ACATGCAAGGATACACACACG R: ACATGGCTGTGCTCAAATGG	(CA)16	176	16
Munsar_12408	F: GATGGTGACTCAGGAGCAGG R: TCATCATCAGTTCTGGTCTTCCG	(ATG)10	107	2
Munsar_12949	F: AAGGAGAATGAGGAAGGGGG R: CTCTCATCCACTCTCGCTCC	(AAGG)8	187	4
Munsar_13779	F: GTGGTTGTGTGCAAGGGC R: ACCACCACCATACGCTCTG	(GTG)7	80	2
Munsar_16736	F: TCCACCTTACTGCATAGCC R: AGCCAGTGGTTTGTGTAATGC	(CA)12	141	5
Munsar_28739	F: AAGCAACACCCTCATCCCTC R: GGTGGGGGTTTAAATGGCTG	(AAC)7	127	3
Munsar_49368	F: CCCACCTCGTTTTAGACCATC R: TACGAGGACATGACACAGGC	(CAC)7	138	5
Munsar_53844	F: AAACATCACCACCCTGAGC R: AATATCTGCCTTCCCTCCGC	(CAT)10	139	4
Munsar_64867	F: GCATCGTTGTGTTGTGGGAG R: CAAAACCTTTACCTGCCGCC	(TGT)24	133	20
Munsar_68897	F: TACGCCAGAGTATTGCAGGG R: GTTTGCCGTGGAGTATAGCC	(ACA)16	119	10

Astarte sulcata

Locus	Primer sequences 5'→3'	Repeat type	Size range (bp)	No. of alleles
Astsul_00667	F: ACCGTTCAAACTGATGCCC R: GGGGATCTAGCTACAATTTCCAAG	(AC)12...(AGAC)7	123 - 137	4
Astsul_01210	F: GCCCTTTTATAGGGCCACAC R: ACGAATACAAGTACAAAAACAACAGAC	(GT)13	114 - 140	7
Astsul_01629	F: AATCGGTGTTAGCACACCAC R: ATACACCACAGTCATTAACACG	(GT)23	182 - 214	5
Astsul_07333	F: AGAGCATAGGGCTCACTGTC R: ACGTACCATCACGTTCCCAG	(ACAT)12	160 - 224	9
Astsul_08250	F: ATTCTAAGTATCGCTCCCGG R: GCCATATGTGGAAGAGCGCC	(GT)11	80 - 109	6
Astsul_09497	F: GGCTAACGGGCTGATTAATGTC R: TCTTCGGTTGGCAGCTACCC	(CA)13	185 - 222	7
Astsul_10997	F: ACGAACACAAGCACATCTCG R: GTCACCACGGACTGGGATAG	(CA)11	126 - 157	6
Astsul_12459	F: TTCTTACGCTGCGCTCATTC R: TGTGTCGCGTTCCAAAACCTG	(ATC)11	230 - 247	3
Astsul_15692	F: AACACGAACATGGGTGACTG R: TTGACAAGACACGCCACG	(TG)13	132 - 156	2
Astsul_15953	F: AACCAGGATTATGTTTGCCG R: TGTTTGCCTGTTTTCTATGCTC	(TACA)9	172 - 208	6

Diastylodes serratus

Locus	Primer sequences 5'->3'	Repeat type	Size range (bp)	No. of alleles
Diaser_005868	F: AACGCGGTCAAATTCCTTCC R: TTCGATGCAAAGAACACGGG	(AC)11	163 - 196	11
Diaser_007210	F: CCTTCAGTCTTTTTGCATATGTTCC R: AACTTCGGTGATAGGGTGCG	(AAT)7	145 - 157	7
Diaser_009782	F: CTCCAATTAGAATGGAAGCCAC R: TCAAAGCCAGCACAACGAAG	(CA)11	154 - 196	10
Diaser_010345	F: TGCATATTACTTTTTTCGTATTTATGCC R: TAACCACCCAAATGACAGCC	(CA)11	149 - 170	13
Diaser_011750	F: AATGCTGGCTCAGGATAGGG R: TCCTGATAACCTATTCACAATGC	(TTGA)7	106 - 162	13
Diaser_014078	F: GTCCATGTCATAGAGATGTTCCC R: CGTTCTCTTGTACACCTGCC	(GA)11	140 - 160	7
Diaser_023678	F: TCCTCTGAGTAGCGTTGTTCG R: ACGGTTGGAGAGGATGAGTG	(AC)11	189 - 216	9
Diaser_025015	F: GATAACGAGACTCCCCCGTC R: TTCATCAATTCGGCGCACTC	(CCG)7	128 - 154	10
Diaser_032180	F: ATTTTTAGAGGTCAAGCTCGC R: AGCTACTGGTAGTCTCATCGC	(CT)12	189 - 215	8
Diaser_033253	F: GACAGCCCTATGTAAAAGGCG R: ACTAACAACAAACAATACTAGATCCCG	(TG)12	68 - 83	5
Diaser_035491	F: GGCGGGAAAAACTAGCCTC R: ACACCCTGGAAATAATAGATCAAAAG	(TG)13	147 - 162	7
Diaser_037958	F: GCCAATTTAATAGAACTCTGCATTCC R: TGACGTTGTTCCATGACAGC	(AC)12	129 - 160	9

Vedlegg B. Stasjoner for prøvetaking

Munida sarsi collections

Location	Date	Station	Coordinates out	Coordinates in	Draw length (m)	Depth range (m)	Equipment
Førdefjorden, inner part	11.05.11	1A1	61°29.514N 005°41.270E	61°29.095N 5°41.654E	950	265-261	RP-sledge
Førdefjorden, inner part	“	1B1	61°28.854N 5°40.562E	61°28.583N 5°39.052E	1000	261-	“
Førdefjorden, inner part	“	1C1	61°28.273N 5°39.626E	-	1556	315-373	“
Førdefjorden, inner part	“	1D1	-	61°28.766N 5°39.227E	1000	262-261	“
Førdefjorden, middle part	12.05.11	2A1	61°28.820N 5°26.882E	61°29.070N 5°24.316E	2200	289-326	“
Førdefjorden, middle part	“	2B1	61°29.046N 5°24.698E	61°29.080N 5°22.668E	1790	320-333	“
Førdefjorden, middle part	“	2D1	61°29.209N 5°18.737E	61°29.344N 5°16.700E	1705	323-321	“
Førdefjorden, inner part	28.03.12	1B2	61°27.076N 5°33.132E	61°27.128N 5°31.217E	106	394-397	Snelli-sledge
Førdefjorden, inner part	“	1D2	61°27.466N 5°27.988E	61°27.601N 5°26.961E	979	293-236	RP-sledge
Førdefjorden, middle part	29.03.12	2A2	61°28.872N 5°26.396E	61°29.061N 5°23.869E	2259	294-327	Snelli-sledge
Førdefjorden, middle part	“	2B2	61°29.223N 5°18.611E	61°29.301N 5°16.667E	1725	322-365	RP-sledge
Førdefjorden, outer part	“	3B	61°30.929N 5°07.355E	61°31.762N 5°06.577E	1686	179-289	“
Førdefjorden, outer part	“	3C	61°30.887N 5°06.903E	61°31.350N 5°06.961E	1435	207-244	“
Sognesjøen, inner part	01.11.11	02RP	61°02.3864N 4°56.5563E	61°03.1493N 4°57.112E	-	187 - 293	“
Sognesjøen, inner part	01.11.11	04TR	61°00.8282N 4°53.3246E	61°01.4365N 4°54.6596E	-	359 - 360	Shrimp trawl
Sognesjøen, innermost part	02.11.11	06RP	61°05.8074N 5°04.7279E	61°05.9123N 5°06.1774E	-	254 - 241	RP-sledge
Sognesjøen, innermost part	02.11.11	07TR	61°05.7268N 5°04.4001E	61°05.933N 5°06.1826E	-	240 - 243	Shrimp trawl
Fjærlandsfjorden	04.11.11	36AG	61°15.6882N 6°37.3871E	61°15.3136N 6°36.4493E	-	238 - 243	Agassiz trawl
Sognesjøen, deepest basin,	05.11.11	43AG	60°54.9165N 4°38.1955E	60°55.2987N 4°38.6774E	-	553 - 547	“
Hardangerfjorden	11.08.11	Hard.	59°57.056N 5°54.088E	59°57.009N 5°52.006E	-	187-216	”
Korsfjorden	15.02.12	Kors.	60°11.516N 5°13.087E	60°08.962N 5°16.975E	1870	673-675	Shrimp trawl
Fensfjorden	26.02.11	Fens.	60°49.980N 5°02.205E	-	-	532	“

Astarte sulcata collections

Location	Date	Station	Coordinates	Depth	Gear
Inner basin of Førdefjorden	05.09.2012	1	61°29.002N 05°40.641E	249 m	Agassiz
Middle basin of Førdefjorden	06.09.2012	2	61° 29.423N 05° 13.997E	336 m	Agassiz
Outer basin of Førdefjorden	06.09.2012	3	61°27.508N 05°27.500E	373 m	Agassiz
Vatlestraumen	01.11.2012	1	60°20.241N 05°11.232E	35 m	Rock-dredge
Vatlestraumen	01.11.2012	2	60°20.224N 05.°11.454E	44 m	Rock-dredge
Vatlestraumen North	02.10.2014	1	60°20.305 N 5°11.116E	30 – 45 m	Triangle dredge
Vatlestraumen South	02.10.2014	1	60°19.775 N 5°09.922 E	20-45 m	Triangle dredge
Romdalsfjorden 1	12.10.2005	28	62°40.67N 6°58.99E	205 m	Sneli-sledge
Romdalsfjorden 2	12.10.2005	30	62°42.73N 7°23.40E	39 m	Sneli-sledge
Romdalsfjorden 2	12.10.2005	31	62°42.67N 7°22.56E	65 m	Sneli-sledge
Julsundet	12.10.2005	33	62°43.81N 6°57.80E	n.a	Rock-dredge
Julneste	12.10.2005	34	62°44.63N 6°57.94E	280 m	Rock-dredge
Freifjorden	12.10.2005	40	63°02.09 N 7°51.82E	100 m	Sneli-sledge
Kvernesfjorden	12.10.2005	41	63°00.05N 7°44.29E	100 m	Sneli-sledge
Jaaholmen	13.10.2005	54	63°00.55N 7°50.70E	13 m	Rock-dredge
Galten	13.10.2005	55	63°00.90N 7°50.40E	120 m	Rock-dredge

Diastylodes serratus collections

Location	Date	Station	Coordinates	Depth	Gear
Inner basin of Førdefjorden	05.09.2012	1	61°29.002N 05°40.641E	249 m	Agassiz trawl
Middle basin of Førdefjorden	06.09.2012	2	61° 29.423N 05° 13.997E	336 m	Agassiz trawl
Outer basin of Førdefjorden	06.09.2012	3	61°27.508N 05°27.500E	373 m	Agassiz trawl
Skagerak	15.05.2009	BioSkag II	58°35,254 N 10°19,395 E	282	RP sledge
Skagerak	19.05.2009	BioSkag II	58°51,456 N 10°26,348 E	246	RP sledge

NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

NIVA gir offentlig vannforvaltning, næringsliv og allmennheten grunnlag for god vannforvaltning gjennom oppdragsbasert forsknings-, utrednings- og utviklingsarbeid. NIVA kjennetegnes ved stor faglig bredde og godt kontaktnett til fagmiljøer i inn- og utland. Faglig tyngde, tverrfaglig arbeidsform og en helhetlig tilnæringsmåte er vårt grunnlag for å være en god rådgiver for forvaltning og samfunnsniv.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00
www.niva.no • post@niva.no